第32卷 第3期 昆 虫 学 报 Vol. 32, No. 3
1989年8月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA Aug., 1989

马铃薯叶甲属六个种的等位基因酶变异*

李 绍 文
(北京大学生物学系,北京)

摘要 用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定了马铃薯叶甲属(*Leptinotarsa*)六个种:马铃薯叶甲(*L. decemlineata*)、胡颓子叶茄叶甲(*L. texana*)、柔毛茄叶甲(*L. rubiginosa*)、膜苞菊叶甲(*L. lineolata*)、蒺藜叶甲(*L. peninsularis*)和蒺藜四条叶甲(*L. tlascalana*)的等位基因酶变异。分析了14种同工酶(ACPH、ADH、AMY、FUM、GDH、GOT、IDH、HBDH、LAP、MDH、ME、PGM、SORDH和XDH)的17个座位。其中单型座位有9个,多型座位有8个,后者占47.1%。六个种的平均杂合度为0.091。其中最高的是膜苞菊叶甲0.154;最低的是蒺藜四条叶甲0.042。六个种彼此之间的遗传距(D)在0.129—0.573之间,说明这六个种的亲缘关系是很密切的。

关键词 马铃薯叶甲 等位基因酶

近二十多年发展起来的分子分类学,主要以电泳资料为基础(Avise, 1974; Berlocher, 1984)。电泳技术能简单和有效地测定个体和种群中的遗传变异。等位基因酶是指由同一座位的不同等位基因编码的酶蛋白,由于它们氨基酸组成和顺序的不同,在电泳中有不同的迁移速率。在种群中,等位基因酶的分离方式是遵从孟德尔规律的。对种内或种间种群的等位基因酶分析,能提供分类和进化的重要资料。

马铃薯叶甲属是鞘翅目叶甲科中的一个小属,起源于墨西哥南部,仅有40余种。Tower (1906) 首次全面地研究了这个属各个种的形态、生态和进化。马铃薯叶甲是这个属中唯一的一种害虫。1860年首次报告它在美国堪萨斯等地取食马铃薯,至今已扩展到欧美大陆的马铃薯栽培区,成为猖獗的大害虫(Hsiao, 1978、1985)。Jacobson 和 Hsiao (1983) 分析了马铃薯叶甲12个种群的同工酶变异。马铃薯叶甲属的各个种均为色泽鲜艳、中等大小的甲虫,都是寡食性的,多数取食茄科植物,有许多相似的形态和生态特点。这个属内各个种之间的亲缘关系早已引起人们的注意。Hsiao 和 Hsiao (1983) 分析了这个属13个种的染色体组型,并讨论了染色体组型的差异与寄主植物及地理分布间的关系。本文报道用聚丙烯酰胺凝胶电泳对马铃薯叶甲属六个种等位基因酶变异测定的结果,并讨论了它们之间的亲缘关系。

材料和方法

供试样品为处于繁殖期的成虫,或收采于田间的寄主植物上,或由采回的成虫繁育而

本文于1987年1月收到。

* 本工作系作者在美国犹他州立大学生物系作访问学者时研究工作的一部分。作者感谢萧定寰教授给予的指导和帮助,以及提供实验条件及材料。

来(长光照 L:D=16:8，25℃，饲以各自的自然寄主植物)。羽化后的成虫再饲喂 7—10 天，以达到繁殖期。达到繁殖期的甲虫即可进行电泳分析或存于低温冰箱(—80℃)。在低温冰箱中存放一年的甲虫，测得的酶活性没有明显的变化。供试样品、采集地点及寄主植物见表 1。

表 1　供试种、寄主植物和采集地

种名	寄主植物		采集地
马铃薯叶甲	马铃薯	*Solanum tuberosum*	美国犹他州
	胡颓子叶茄	*S. elaeagnifolium*	美国亚利桑那州
胡颓子叶茄叶甲	胡颓子叶茄	*S. elaeagnifolium*	美国得克萨斯州
柔毛茄叶甲	柔毛茄	*S. pubescens*	美国亚利桑那州
膜苞菊叶甲	膜苞菊	*Hymenoclea monogyra*	美国亚利桑那州
蒺藜四条叶甲	大花拟蒺藜	*Kallstroemia gradiflora*	美国亚利桑那州
蒺藜叶甲	大花拟蒺藜	*Kallstriemia gradiflora*	美国亚利桑那州

共测定了 18 种同工酶：酸性磷酸酶 (ACPH)、醇脱氢酶 (ADH)、淀粉酶 (AMY)、醛氧化酶 (AO)、酯酶 (EST)、延胡索酸酶 (FUM)、葡萄糖脱氢酶 (GDH)、谷草转氨酶 (GOT)、异柠檬酸脱氢酶 (IDH)、羟基丁酸脱氢酶 (HBDH)、亮氨酸氨基肽酶 (LAP)、苹果酸脱氢酶 (MDH)、苹果酸酶 (ME)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G-6-PDH)、葡糖磷酸变位酶 (PGM)、山梨醇脱氢酶 (SORDH)、酪氨酸酶 (TYR) 和黄嘌呤脱氢酶 (XDH)。

聚丙烯酰胺凝胶电泳按 Hsiao 和 Stutz (1985) 的方法。AO、ME、IDH 和 XDH 使用 5% T，3.5%C 的分离胶，并有 1 厘米的浓缩胶；ADH、EST、FUM、GDH、GOT、G-6-PDH、HBDH、LAP 和 SORDH 使用 7%T、3.5%C 的分离胶并有 1 厘米的浓缩胶；AMY 和 PGM 仅用 7%T、3.5%C 的分离胶而不用浓缩胶；ACPH 和 MDH 仅用 9%T 和 3.5%C 的分离胶。

单个甲虫置于组织匀浆器的玻管中，加 0.5 毫升 20% 蔗糖溶液，在冰浴中匀浆，然后转移至 1.5 毫升的塑料离心管中，在冰冻离心机中 (3℃) 10000g 离心 10 分钟。上清液移至另一离心管中，方法同上再离心一次。上清液在液氮中保存一周至数月，酶活性无明显损失。点样量为 10 微升。用溴甲酚蓝做指示染料，肌红蛋白作酶带迁移的对照标准。电泳在 2—4℃ 的冷室中进行。指示染料在分离胶中行距为 55 毫米(只有 ME 为 30 毫米)，电泳时间约 2.5—3 小时。

染色方法：FUM、IDH、LAP 和 PGM 仿 Terranova (1981)，GDH、HBDH 和 SORDH 仿 Shaw 和 Prasad (1970)，其他各酶均按 Hsiao 的 Stutz (1985) 的方法。

等位基因的编号：用被它编码的等位基因酶的迁移距离与肌红蛋白的迁移距离的比值来表示。多型座位是指该座位最常见的等位基因频率小于或等于 0.99。杂合度的期望值 (He) 是由 Hardy-Weinberg 平衡公式 (Ferguson，1980) 计算来的。通过 χ^2 测定检验杂合度的观察值 (H_o) 和期望值的符合程度。按照 Nei (1972) 的方法计算各种间的遗传相似度 (I) 和遗传距 (D)。按成对组无权数平均值 (The unweighted pair-group

arithmetic average，简称 UPGMA；Ferguson，1980）方法组画系统树。

结　　果

在测定的 18 种同工酶中，AO、EST、G-6-PDH 和 TYR 等 4 种同工酶虽都有相当大的遗传变异，但判读有困难，因此，未作进一步的统计分析。能作出满意的遗传学判读的有 17 个座位，它们分属于 14 个同工酶。其中 8 个座位在一个或多个种中是多型座位，存在两个以上不同的等位基因，其酶谱如图 1、2。7 个座位（ADH-1、AMY、FUM、GDH、MDH-1、MDH-2、PGM）在 6 个种中都是单型座位，如图 3。另外二个酶 IDH 和 SORDH 在 6 个种中也都表现为单型座位，但它们的迁移距离在 6 个种中是不同的，可以看作是由种间不同的等位基因编码的（Menken，1980）。

ACPH　ADH-2　ADH-3　GOT
1/1　2/2　3/3　1/1　1/2　2/2　1/1　1/2　2/2
LAP　HBDH　ME　XDH
1/1　2/2　3/3　4/4
0　+

图 1　马铃薯叶甲属 6 个种多型座位酶谱示意图
酶谱下方的数字表示该酶谱的基因型，"0"是电泳的起点

各同工酶谱简要描述如下：

ACPH　有许多条染色清晰的带，但只有迁移最快的区带能作出遗传学判读。该座位有三个等位基因，杂合子有两条带，表明它是单体的酶。

ADH　这是一组能清楚判读的酶，能分辨出三个座位。ADH-1 仅有一条带，是单型座位。ADH-1 仅出现在蒺藜叶甲和蒺藜四条叶甲两个种中。ADH-2 在杂合子中是三条带，表明该酶是典型的二聚体的酶。ADH-3 有多个等位基因，杂合子是三条带。唯有膜苞菊叶甲同合子是两条带，杂合子是四条带。

AMY、FUM、GDH、PGM　在 6 个种中都是一条带，是单型座位。

GOT　在膜苞菊叶甲中，该座位的杂合子是两条带，表明该酶是单体的酶。在其余各种中，都是单型座位。

HBDH　在胡颓子叶茄叶甲中，杂合子是三条带，可知它是二聚体的酶。在其余各个种中，都是单型座位。

IDH、SORDH　在 6 个种中，这两个酶都只有一条带，但在不同种中，迁移距离不同。

LAP　有 4 个不同的等位基因。杂合子是两条带，可知它是单体的酶。

MDH 在各种中都有两条明显的活性带 MDH-1 和 MDH-2，都是单型座位；其他区带染色较浅，难以清楚地辨认和判读。

ME 杂合子有两条带，是典型单体的酶。

XDH 在各个种中，杂合子呈现两条带，是单体的酶。

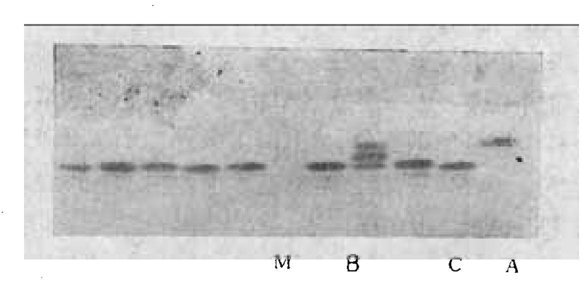


图 2 马铃薯叶甲 ADH-3 的酶谱
A. 同合子 1/1，B. 杂合子 1/2，C. 同合子 2/2，M. 肌红蛋白

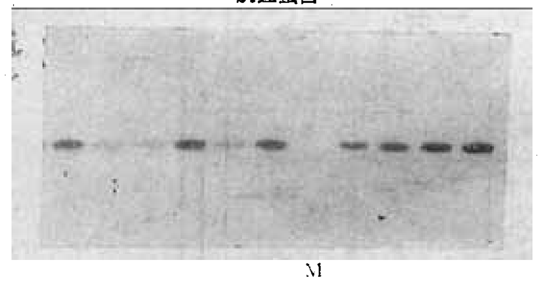


图 3 膜苞菊叶甲 FUM 的酶谱(单型座位)
M. 肌红蛋白

FUM 和 GDH 在所测定的 11 个种中(除上述 6 个种外，还包括 *L. defecta*、*L. haldmani*、*L. juncta*、*L. tumamonca* 和 *L. undecemlineata*)，都只有一条迁移率相同的带，是由同一基因编码的。因而，可把这两个酶看作马铃薯叶甲属的特征。在测定的 6 个种中，单型座位的比例是 52.9%； 8 个座位在 1 个或几个种中是多型座位，占 47.1%。在不同的种中，多型座位的比例有很大的差别，例如，在膜苞菊叶甲中为 46.2%，而在蒺藜四条叶甲中仅为 12.5%。这种情况类似于 Wenken (1980) 对巢蛾属 (*Yponomeuta*) 9 个种的研究。他发现种间多型座位比例的差别是相当大的，从 8% 到 49%。

平均杂合度最大的种是膜苞菊叶甲 0.154；最小的种是蒺藜四条叶甲 0.042。这些值和已报道的许多昆虫相比，稍微偏低 (Ferguson, 1980)，而与 McDonnald 等 (1985) 测定的另一种叶甲 *Diabrotica barberi* 的平均杂合度的值 0.081 相近。马铃薯叶甲的平均杂合度为 0.100，这个值低于 Jacobson 和 Hsiao (1983) 的结果(0.206)。造成这个差别的原因可能是几个多态性的酶，如 EST、TYR 等未被包括在这个统计中的缘故。经 χ^2 测验，6 个种的 ADH-2、ADH-3、HBDH、ME 和 XDH (XDH 不包括马铃薯叶甲)的杂合子频率的观察值，都符合 Hardy-Weinberg 平衡的期望值。LAP 和 GOT 在 6 个种中都显著地偏离了期望值。

在染色深浅、带型和等位基因频率方面，未发现有性别间的差异。多型座位的等位基因频率、杂合度的观察值和期望值以及多型座位的比例列于表 2。

6 个种的遗传相似度 (I) 和遗传距 (D) 列于表 3 中。膜苞菊叶甲和其他 5 个种的遗传相似度在 0.696—0.564 之间，小于其他 5 个种彼此之间的值。蒺藜四条叶甲和蒺藜叶甲两个种的遗传相似度最大，为 0.879。图 4 是由 6 个种的遗传相似度组画的系统树。

表2　马铃薯叶甲属6个种的等位基因频率、观察杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e)、平均杂合度 (H) 和多型座位比例 (P)

座位	等位基因	蒺藜叶甲	蒺藜四条叶甲	马铃薯叶甲	柔毛茄叶甲	胡颓子叶茄叶甲	膜苞菊叶甲
ACPH	N*	50	50	50	50	50	50
	1.04	0	0	0	0	0.960	0.750
	1.23	1.00	1.00	0.850	1.00	0.040	0.250
	1.35	0	0	0.150	0	0	0
	H_o	0	0	0.020**	0	0**	0.180
	H_e	0	0	0.255	0	0.077	0.375
ADH-1	N	45	40	50	50	50	50
	0.31	1.00	1.00	0	0	0	0
ADH-2	N	50	50	50	40	50	50
	0.50	0	0	0.290	1.00	0	0
	0.66	0	0	0.710	0	1.00	0
	H_o	0	0	0.460	0	0	0
	H_e	0	0	0.412	0	0	0
ADH-3	N	50	50	50	50	50	50
	1.05	0	0	0	0	0	0.590
	1.19	0.120	0	0.090	0	0	0
	1.25	0	0	0	0	0	0.410
	1.35	0.880	1.00	0.910	1.00	1.00	0
	H_o	0.240	0	0.140	0	0	0.460
	H_e	0.211	0	0.164	0	0	0.484
AMY	N	50	40	50	50	50	50
	1.35	1.00	1.00	1.00	1.00	0	0
GOT	N	50	50	50	50	50	50
	1.15	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.730
	1.29	0	0	0	0	0	0.270
	H_o	0	0	0	0	0	0.020**
	H_e	0	0	0	0	0	0.394
HBDH	N	50	50	50	50	50	50
	0.20	1.00	1.00	0	0	0.360	0
	0.44	0	0	0	1.00	0.640	1.00
	H_o	0	0	0	0	0.440	0
	H_e	0	0	0	0	0.460	0
IDH	N	43	42	50	50	50	50
	1.03	1.00	0	1.00	1.00	0	0
	1.13	0	1.00	0	0	1.00	0
LAP	N	50	50	50	50	50	50
	0.10	0	0	0	0	0	0.960
	0.14	0.100	1.00	0	0.420	0	0.040
	0.21	0.900	0	0	0.580	0.420	0
	0.34	0	0	1.00	0	0.580	0
	H_o	0**	0	0	0**	0.120	0**
	H_e	0.180	0	0	0.487	0.487	0.077

表 2(续)

ME	N	50	41	50	50	50	44
	0.42	0.410	0.439	0.510	0.530	0.430	0.591
	0.54	0.590	0.561	0.490	0.470	0.570	0.409
	H_o	0.540	0.585	0.420	0.660	0.660	0.409
	H_e	0.484	0.493	0.500	0.498	0.490	0.483
SORDH	N	35	40	50	50	50	50
	0.47	0	0	0	0	0	1.00
	0.59	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0
XDH	N	43	50	50	50	50	50
	0.65	0.849	0.900	0.910	0.900	0.970	0.890
	0.77	0.151	0.100	0.090	0.100	0.030	0.110
	H_o	0.209	0.080	0.020**	0.080	0.020	0.060
	H_e	0.256	0.180	0.164	0.180	0.058	0.196
H		0.071	0.042	0.100	0.073	0.105	0.154
SE of H		(0.035)	(0.032)	(0.043)	(0.042)	(0.050)	(0.060)
P		0.250	0.125	0.333	0.188	0.333	0.462

* N= 测定的个体数。
** 经 χ^2 测定为差异显著 ($P<0.01$)

表 3 马铃薯叶甲属 6 个种的 Nei 氏遗传相似度 (I, 对角线以上)和遗传距 (D、对角线以下)

种	蒺藜叶甲	蒺藜四条叶甲	马铃薯叶甲	柔毛茄叶甲	胡颓子叶茄叶甲	膜苞菊叶甲
蒺藜叶甲	—	.879	.843	.856	.779	.645
蒺藜四条叶甲	.129	—	.771	.778	.752	.564
马铃薯叶甲	.171	.261	—	.875	.788	.596
柔毛茄叶甲	.155	.251	.134	—	.730	.651
胡颓子叶茄叶甲	.250	.285	.238	.315	—	.696
膜苞菊叶甲	.439	.573	.517	.429	.363	—

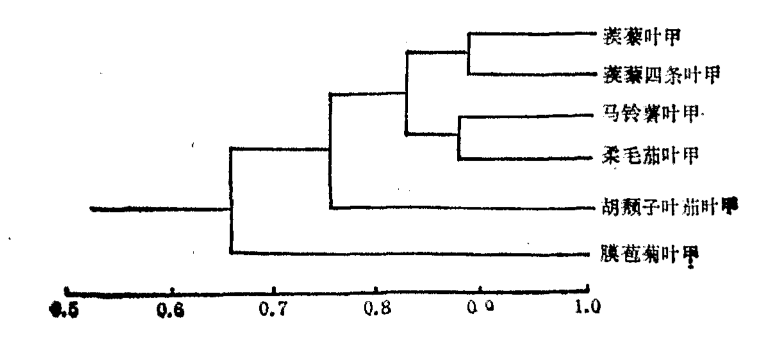


图 4 马铃薯叶甲属 6 个种的系统树

讨　论

马铃薯叶甲属中，除马铃薯叶甲广泛分布于欧美大陆的马铃薯栽培区外，其他各个种均分布在北美洲，大部分种的分布区都比较狭窄。如蒺藜叶甲、柔毛茄叶甲、胡颓子叶茄叶甲和膜苞菊叶甲等种的分布范围都不超过纬度 10° (T. H. Hsiao 和 C. Hsiao, 1983)。它们都是寡食性的，马铃薯叶甲、柔毛茄叶甲和胡颓子叶茄叶甲是取食茄科植物的；蒺藜叶甲和蒺藜四条叶甲是取食蒺藜科植物的；膜苞菊叶甲是取食菊科植物的。本实验测定的 6 个种在形态、生态习性和地理分布上有许多相似之处，但又有明显的差别。经等位基因酶测定，6 个种彼此之间的遗传相似度在 0.879—0.564 之间。这个值显然高于果蝇 (*Drosophila*) 亲缘种之间的 0.563 的遗传相似度 (Ayala, 1975)；而与巢蛾属的 7 个种之间的遗传相似度 0.864—0.471 (Menken, 1980) 相近；也与夜蛾科 Xestia 属 3 个种之间的遗传相似度 0.911—0.633 (Hudson 和 Lefkovitch, 1982) 相近。

从系统树上可以明显看出，蒺藜叶甲、蒺藜四条叶甲、马铃薯叶甲和柔毛茄叶甲之间的亲缘关系很近，遗传相似度在 0.879—0.771 之间。膜苞菊叶甲和其他 5 个种的亲缘关系较远，有两个鉴定性的酶 (GOT 和 SORDH) 能把该种和其他 5 个种区别开来。由系统树还可看出 6 个种的亲缘关系的远近和食性、地理分布无明显的相关性。蒺藜叶甲和马铃薯叶甲的寄主植物完全不同，但它们之间的遗传相似度为 0.843；而马铃薯叶甲和胡颓子叶茄叶甲都以茄科植物为食，但它们之间的遗传相似度却为 0.779。经等位基因酶测定，证明所测定的是亲缘关系紧密的 6 个种。

参　考　文　献

Anderson, W. W., C. W. Berisford, & R. H. Kimmich, 1979 Genetic differences among five populations of the southern pine beetle. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 72: 323—7.

Avise, J. C. 1974 Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.* 23: 465—81.

Ayala, F. J. 1975 Genetic differentiation during the speciation process. *Evol. Biol.* 8: 1—75.

Berlocher, S. H. 1984 Insect molecular systematics. *Ann. Rev. Ent.* 29: 403—33.

Ferguson, A. 1980 Biochemical systematics and evolution. John Wiley and Sons, Inc., New York.

Hsiao, T. H. 1978 Host plant adaptations among geographic populations of the Colorado potato beetle. *Entomol. Exp. Appl.* 24: 437—47.

Hsiao, T. H. 1981 Ecophysiological adaptations among geographic populations of the Colorado potato beetle in North America, pp. 69—85. In J. Lashomb and R. Casagrande [eds.], Advances in potato pest management. Hutchinson and Ross Publishing Co., Stroudsburg, Pa.

Hsiao, T. H. and C. Hsiao 1983 Chromosomal analysis of *Leptinotarsa* and *Labidomera* species (Coleoptera: chrysomelidae). *Genetica* 60: 139—50.

Hsiao, T. H. and J. M. Stutz 1985 Discrimination of alfalfa weevil strains by allozyme analysis. *Entomol. Exp. Appl.* 37: 113—21.

Hsiao, T. H. 1985 Ecophysiological and genetic aspects of geographic variation of the Colorado potato beetle. Proceeding of the Symposium on the Colorado Potato Beetle, XVIIth International Congress of Entomology. Ferro, D. N. and R. H. Voss [eds].

Hudson, A. & Lefkovitch, L. P. 1982 Allozyme variation in four Ontario population of *Xestia adela* and *Xestia dolosa* and in a British population of *Xestia c-nigrum* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 75: 250—6.

Jacobson, J. W. & T. H. Hsiao 1983 Isozyme variation between geographic populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Ann. Ent. Soc. Am.* 76: 162—6.

McDonald, I. C., J. L. Krysan & O. A. Johnson 1985 Genetic variation within and among geographic population

of *Diabrotica barberi* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 78: 271—8.

Menken, S. B. 1980 Biochemical genetics and systematics of small Ermine Moths (Lepidoptera, Yponomeutidae), allozyme polymorphism and the speciation process in small Ermine Moths (Lepidoptera, Yponomeutidae). J. T. Wiebes (ed).

Nei, M. 1972 Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283—92.

Shaw, C. R. & R. Prasad 1970 Starch gel electrophoresis of enzyme——a compilation of recipes. *Biochem. Gen.* 4: 297—320.

Stock, M. W., & J. D. Guenther 1979 Isozyme variation among mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae*) populations in the Pacific Northwest. *Environ. Entomol.* 8: 889—93.

Stock, M. W. & G. D. Amman 1980 Genetic differentiation among mountain pine beetle populations from lodgepole pine and ponderosa pine in northeast Utah., *Ann. Entomol. Soc. Am.* 73: 472—8.

Terranova, A. C. 1981 Polyacrylamide gel electrophoresis of *Anthonomus grandis* Boheman proteins. USDA, SEA, Agr. Res. Results ARR-S-9. pp. 48.

Tower, W. L. 1906 An investigation of evolution in chrysomelid beetles of the genus Leptinotarsa Carnegie Institution of Washington. No. 48, Washington, D. C. 320pp.

ALLOZYME VARIATION IN SIX SPECIES OF *LEPTINOTARSA* (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE)

Li Shao-wen

(Department of Biology, Peking University, Beijing)

Allozyme variation has been studied by polyacrylamide gel electrophoresis in 6 *Leptinotarsa* species: *L. peninsularis, L. tlascalana, L. decemlineata, L. rubiginosa, L. texana* and *L. lineolata*. Seventeen gene loci from 14 enzymes (ACPH, ADH, AMY, FUM, GDH, GOT, IDH, HBBH, LAP, MDH, ME, PGM, SORDH, and XDH) were analyzed. The proportion of polymorphic loci was 42.6%. Average heterozygosity for the 6 species was 0.083. Nei's genetic distances (D) among the 6 species were 0.129—0.573, indicating that these species are closely related.

Key words *Leptinotarsa* spp.——allozyme